

発蛍光性NAD(P)+検出プローブを利用したシトクロムP450分子群の基質特異性解析法の開発

著者	守谷 崇
号	47
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第503号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121638

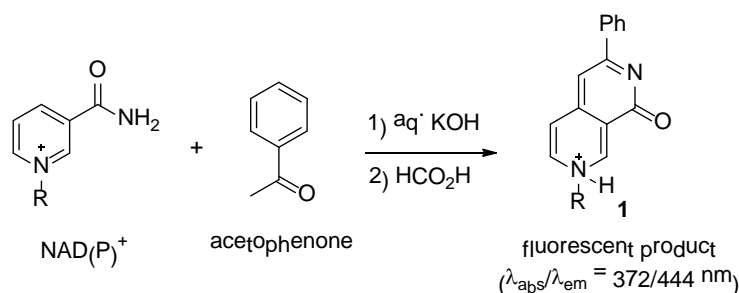
発蛍光性 NAD(P)⁺ 検出プローブを利用した シトクロム P450 分子群の基質特異性解析法の開発

合成制御化学分野 守谷 崇

シトクロム P450 は、基質となる有機小分子に酸素原子を添加する一群の酸化酵素であり、薬物代謝やホルモン、二次代謝産物の生合成など、生体内で様々な重要な役割を担っている。2013 年の時点で 21,000 種以上の P450 遺伝子が報告されているが、現在でも機能や生理基質が不明な分子種が多数存在する。これらの機能を理解する上で、P450 の生理基質や基質特異性を明らかにすることは重要である。P450 の基質を検出する方法として、酸化生成体の GC/MS や LC/MS を用いた検出が一般的に知られている。しかし、この方法では一度に評価できる基質候補小分子の数に限界があり、迅速かつ網羅的に P450 の基質を特定できないことが P450 研究のボトルネックとなっている。この状況を解決するために、発表者らは NADH 固定化基板上に形成させた小分子マイクロアレイと、基質の酸化に伴い生じた NAD⁺ を検出するプローブを用いた P450 基質検出法を開発した^[1]。P450 が基質を酸化するためには、分子状酸素を活性化するための電子供給源である NAD(P)H とその伝達系タンパク質が必要であり、特に NAD(P)H は化学量論量消費されるため、本手法はこの原理を利用している。しかし、この方法を P450 基質のハイスループットスクリーニングに適用するには、検出感度とシグナルバックグラウンド比に問題が残されていた。そこで、発表者は新たな高感度 NAD(P)⁺ 検出法を開発し、その手法を用いた P450 基質の迅速かつ網羅的な判定システムの確立を本研究の目的とした。

1. 高感度 NAD(P)⁺ 検出法の開発

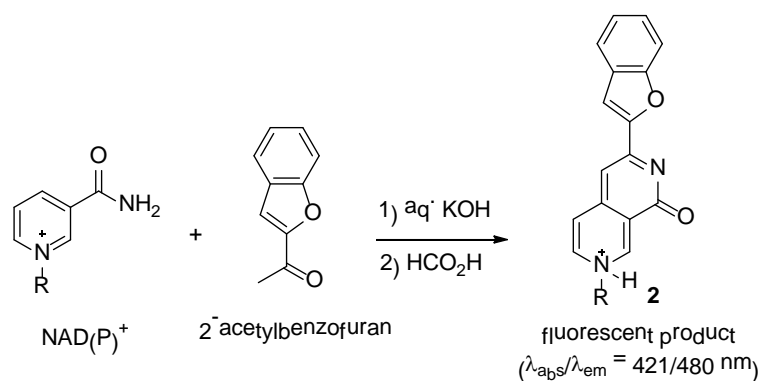
NAD(P)⁺ を検出する方法として、マイクロアレイの例と同様にアセトフェノンを利用する方法を用いることとした (Scheme 1)。この方法では、NAD(P)⁺ とアセトフェンを反応さ



Scheme 1: Reaction of NAD(P)⁺ with acetophenone

せ、得られた蛍光色素 **1** ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 372/444 \text{ nm}$) の蛍光量を定量する。本手法は NAD(P)⁺ が関与する様々な酵素の基質および阻害剤アッセイに利用可能であるが、P450 基質のハイスループットスクリーニングに適用するには、共存する NAD(P)H や基質候補化合物の影響を受けずに、高感度に NAD(P)⁺ を検出できる、**1** に代わる蛍光色素が求められた。

そこで、まず反応させるケトンの最適化により生成する蛍光色素の蛍光特性の向上を企図し、アセトフェノンの代わりとなる 60 種類以上のメチルケトン類と環状ケトン類をスクリーニングした。スクリーニングにおいてヒットした化合物の詳細な構造活性相関解析と反応速度解析を行なった結果、2-アセチルベンゾフランが NAD(P)^+ と迅速に反応し、高い蛍光強度と長波長シフトした励起/蛍光極大波長 ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 421/480 \text{ nm}$) を併せ持つ新規蛍光色素 **2** を与えることを見出した (Scheme 2)。

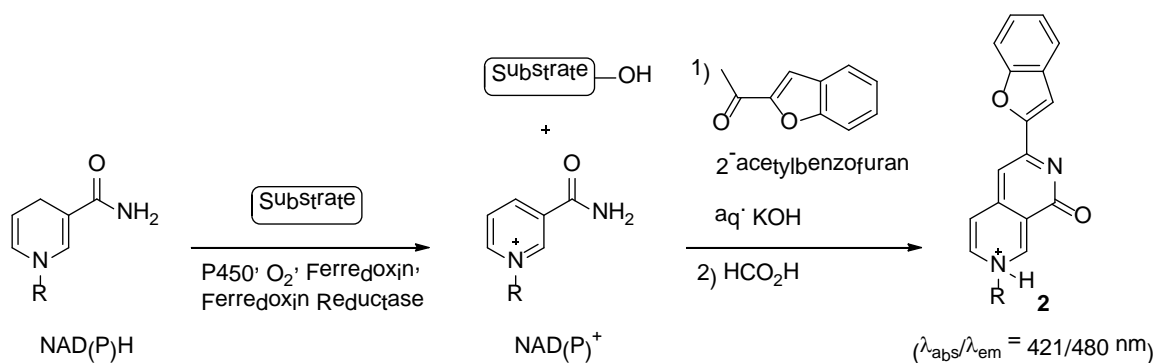


Scheme 2: Reaction of NAD(P)^+ with 2-acetylbenzofuran

次に、開発した 2-アセチルベンゾフランを利用する NAD(P)^+ 検出法と、これまでに報告されている 4 種類の NAD(P)^+ 検出法、すなわち (1) NAD(P)H の紫外領域の吸収を利用する方法、(2) NAD(P)H の蛍光を利用する方法、(3) アルカリ法、(4) アセトフェノンを利用する方法、の比較を行った。比較の結果、2-アセチルベンゾフランを用いることで、これまでに報告されている NAD(P)^+ 検出法より、高い蛍光強度にて NAD(P)^+ を検出することに成功した。また、アッセイ系の質を示す指標である Z' 値も、最高値の 1 に近い良好な値 ($Z' = 0.96$) を示し、開発した NAD(P)^+ 検出法がハイスループットスクリーニングに適する質の高いアッセイ系であることを確認した。

2. シトクロム P450 分子群の基質特異性解析法の開発

開発した NAD(P)^+ 検出法を用いて、P450 による基質の酸化を判別することが可能か検討を行った。96 ウェルマイクロプレート中で基質候補小分子、P450、還元酵素系、および NAD(P)H を反応させると、基質の入ったウェル中では、基質の酸化に伴い NAD(P)H が消費され、 NAD(P)^+ が生成する。生成した NAD(P)^+ を 2-アセチルベンゾフランと反応させ、反応溶液の蛍光強度を測定することでウェル中の小分子が基質となり得るかを判断した (Scheme 3)。



Scheme 3' Detection of substrate oxidation by the 2-acetylbenzofuran method

まず、モデル実験として、巨大菌 *Bacillus megaterium* 由来の P450BM3 および緑膿菌 *Pseudomonas putida* 由来の P450cam と、それぞれの生理基質である長鎖脂肪酸およびカンファーを含む 21 種類の P450 基質ライブラリーを用いて、各 P450 の基質の判別を検討した。その結果、NAD(P)H や蛍光性の基質候補化合物の影響を受けることなく、基質候補ライブラリー中からそれぞれの P450 の基質を正確に判別することに成功し、開発した検出法が P450 基質のハイスループットスクリーニングに適する方法であることを確認した (Figure 2)。また、P450 を過剰発現させた大腸菌細胞やその抽出液を酵素源として用いても、基質の判別が可能であることが分かった。

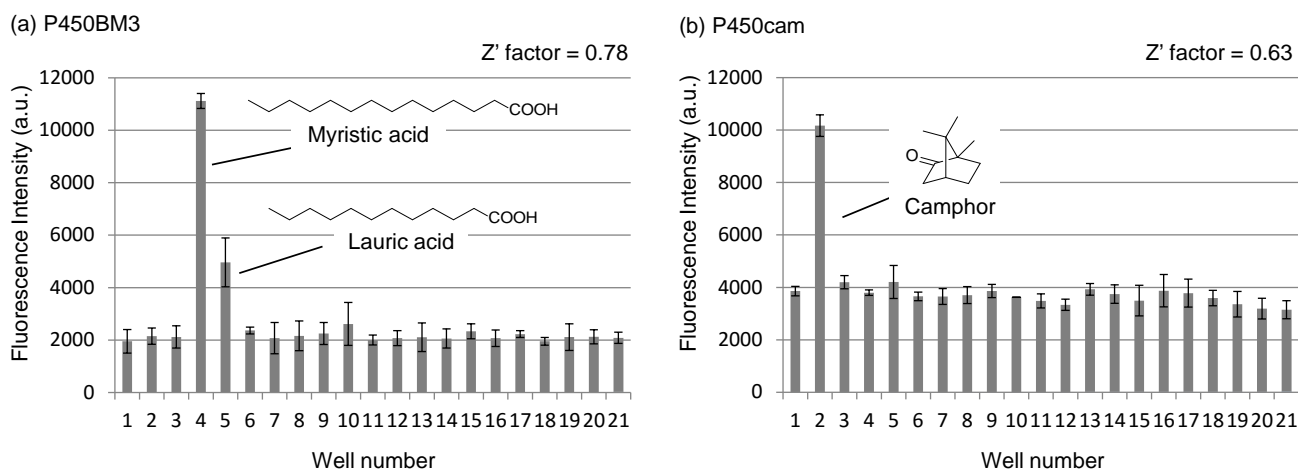


Figure 2. Detection of substrates for (a) purified P450BM3 and (b) purified P450cam.

次に、今回開発した NAD(P)⁺ 検出法を既存の基質結合スペクトル解析や LC/MS 法と組み合わせることで、網羅的な P450 基質特異性解析システムの構築を検討した。化合物ライブラリーとしては当研究室所蔵の合成サンプルおよび試薬からなる 1053 種類の化合物を、P450 としては P450BM3 および P450cam を用いた。まず一次スクリーニングとして、先に開発した NAD(P)⁺ 検

出法により NAD(P)H から NAD(P)⁺ への変換を促進する小分子を検出した。次にヒットした小分子が基質として P450 に結合するかを確認するため、二次スクリーニングとして基質結合スペクトルの測定を行った。これらのスクリーニングにより絞り込まれた基質候補小分子に関しては、別途 P450 による酸化反応を行い LC/MS により酸化生成物の解析を行った。一連のスクリーニングの結果、P450 により酸化される基質小分子を判別することに成功したが、自身は酸化されずに NAD(P)H の消費のみを引き起こす偽陽性小分子が一次スクリーニングにおいて多数ヒットするということが分かった。

偽陽性がヒットした原因として、還元酵素系による NAD(P)H の消費を促進する小分子と、自身は酸化されずに NAD(P)H の消費のみを促進する uncoupling 反応を誘起する小分子の存在が考えられた。このような偽陽性小分子を効率よく除外するために、還元酵素系のみ存在する条件で小分子を反応させた際の NAD(P)⁺ の検出と、uncoupling 反応に伴い生成する過酸化水素の検出を組み合わせた結果、偽陽性の低減に成功した。このように、開発した NAD(P)⁺ 検出法と過酸化水素検出法を組み合わせることで、P450 基質のみを判定できるハイスループット判定システムのプロトタイプを構築することに成功した。

以上、発表者は、シトクロム P450 基質のハイスループットスクリーニング法を確立するため、NAD(P)⁺ 反応性ケトンの最適化を行うことで、2-アセチルベンゾフランを利用する高感度 NAD(P)⁺ 検出法の開発に成功した。次に、開発した検出法を過酸化水素検出法と組み合わせることで、P450 基質のみを判定できるハイスループット判定システムのプロトタイプを構築することに成功した。ハイスループットな過酸化水素検出法が開発され、今回開発した NAD(P)⁺ 検出法と組み合わせられることで、シトクロム P450 基質の実用的ハイスループット判定システムの確立が期待される。

参考文献

- [1] H. Takayama, S. Takahashi, T. Moriya, H. Osada, Y. Iwabuchi, N. Kanoh, *Chembiochem*, **2011**, *12*, 2748-2752.
- [2] T. Moriya, A. Kawamata, Y. Takahashi, Y. Iwabuchi, N. Kanoh, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11500-11502.

論文提出者: 守谷 崇

論文審査委員 (主査): 岩渕 好治

論文題目: 発蛍光性 NAD(P)⁺ 検出プローブを利用したシトクロム P450 分子群の基質特異性解析法の開発

有機小分子に酸素原子を添加する酸化酵素シトクロム P450 は、薬物代謝やホルモン、二次代謝産物の生合成など、生体内で様々な役割を担う。これまで 21,000 種以上の P450 遺伝子が報告されているが、今なお機能や生理基質が不明な分子種が多数存在しており、その生理基質や基質特異性の解明が待たれている。本論文の著者は、迅速かつ網羅的に P450 の基質の特定を可能とする新規方法論の開発を行った。

まず、NAD(P)⁺ とアセトフェノンの縮合反応によって蛍光色素を生成・定量する方法を参考として、高感度に NAD(P)⁺ の検出を可能とする新規蛍光色素を探索した。アセトフェノンの代替と期待されるメチルケトン類および環状ケトン類 60 種類以上をスクリーニングし、そのヒット化合物の詳細な構造活性相関解析と反応速度解析を行なった結果、2-アセチルベンゾフランが NAD(P)⁺ と迅速に反応して、高い蛍光強度と長波長シフトした励起/蛍光極大波長 ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 421/480 \text{ nm}$) を併せ持つ新規蛍光色素を与えることを見出した。本法は、共存する NAD(P)H や基質候補化合物の影響を受けずに、これまでに報告されている何れの NAD(P)⁺ 検出法より高い蛍光強度にて NAD(P)⁺ を検出するとともに、ハイスループットスクリーニングに適するものであった。

次いで、本法を用いて、P450 による基質の酸化の判別を検証した。巨大菌 *Bacillus megaterium* 由来の P450BM3 および緑膿菌 *Pseudomonas putida* 由来の P450cam と、それぞれの生理基質である長鎖脂肪酸およびカンファーを含む 21 種類の P450 基質ライブラリーを用いて、各 P450 の基質の判別を検討した結果、基質候補ライブラリー中からそれぞれの P450 の基質を正確に判別することに成功した。また、P450 を過剰発現させた大腸菌細胞やその抽出液を酵素源として用いても、基質の判別が可能であった。さらに、今回開発した NAD(P)⁺ 検出法を既存の基質結合スペクトル解析や LC/MS 法と組み合わせることで、網羅的な P450 基質特異性解析システムの構築を期して検討を行い、還元酵素系による NAD(P)H の消費を促進する小分子と、自身は酸化されずに NAD(P)H の消費のみを促進する uncoupling 反応を判別する方法について重要な知見を得た。すなわち、還元酵素系のみ存在する条件で小分子を反応させた際の NAD(P)⁺ の検出と、uncoupling 反応に伴い生成する過酸化水素の検出を組み合わせた結果、偽陽性の低減に成功した。

以上、本論文の著者は、2-アセチルベンゾフランを利用する高感度 NAD(P)⁺ 検出法の開発に成功し、開発した検出法を過酸化水素検出法と組み合わせることで、P450 基質を判定できるハイスループット判定システムのプロトタイプを構築することに成功した。本法は、ハイスループットな過酸化水素検出法との連結により、シトクロム P450 基質の実用的ハイスループット判定システムとしての活用が期待される。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。